

Staphylococcus aureus Stable L-Form の透析培養について

佐藤平二

(家畜微生物学研究室)

昭和53年8月31日 受理

Dialysed Culture of *Staphylococcus aureus* Stable L-Form

Heiji SATO

(Laboratory of Veterinary Microbiology)

緒 言

Klieneberger¹²⁾の *Streptobacillus moniliformis* L-form の発見以来多くの細菌種においてそのL型の存在が証明されており、今日では抗生物質の使用によりL型の誘導が容易になっている。L型はその特異的な細胞構造から細菌生理学研究の好個の対象となり得る上に、抗生物質との関係⁹⁾、細胞壁欠損性¹³⁾アミノ酸濃度とL型化との関係^{7,4)} lysozyme による変形²³⁾、抗血清と補体による誘導⁵⁾などの報告から、細菌の薬剤耐性、細菌性慢性疾患、感染症の再発、感染症治癒後の菌の体内残留¹⁾などとの関連において多くの研究者の興味を抱く所となっている^{11,16,20)} 事実細菌性疾患よりの臨床材料からL型分離の報告は多数にのぼっているが^{11,16,20)}しかし今日なおL型の感染症における明確な意義については必ずしも諸家の一致をみていない。その理由としては、方法論の困難さにも因るがL型自身の定義の不明確なことも一因であると考えられる。L型の criteria の一は cell wall の欠落にあるが、細菌細胞壁成分の欠落の程度が異っても protoplast 様の球状形態をとれば、それらを同等視して論議していることにも問題がある。この観点からすれば stable L-form と transient L-form の区別は大そう重要であり、不可逆的 stable L-form についての知見がL型研究の基本になるべきものであらうと考えられるのである。そこで著者は stable L-form の誘導とL型の研究に必要な十分な菌量採集のための液体培養および培地成分を混入しない chemically defined medium による培養を *Staph. aureus* を用いて試み、二三の興味ある知見を得たのでその一端を報告する。

材料および方法

使用菌株 人病巣由来の *Staphylococcus aureus* で

phage typing のためカナダ厚生省 Laboratory Center for Disease Control に送付された株のうち23株を選び実験に供した。

L型の誘導 誘導用培地としては Young²²⁾の用いた培地をやゝ修飾したものでブレインハートインフュージョン寒天 (BHI 寒天 Difco) に食塩を5%に加えて高圧滅菌したのちメチシリン450 μ g/ml, 65°C30分非働化人プラズマ (Grandisland Lab. New York) 20%をそれぞれ終末濃度とするように加えた平板を作り、これに菌を塗抹してL型の誘導を試み、二代目以降はメチシリン、プラズマの濃度を減じた培地に継代し安定化を試みた。L型の発現をみたものでは寒天のみを除去した液体培地での継代も試みた。

L型の透析培養 誘導されたL型菌は前記L型用固型培地に高圧滅菌したセロファンシートを敷いた上に接種し透析培養を行った。また500mlメスシリンダーに5%食塩加 BHI broth を250ml 入れ、ガラス管にセロファンサックを装着してメスシリンダー内に入れ綿栓し高圧滅菌後非働化人プラズマを5%に加えた。別に medium 199 (Hanks) 50ml に少量 (5ml) の液体培養L型を接種し、それを注射器でゴム栓をしたガラスチューブを通してセロファンサック内に注入し、メスシリンダーごと 37°C で培養した。

L型菌体の染色 L型の染色にはブドー糖サフラニン液¹⁸⁾(サフラニン1%, ブドー糖12%, 硫化マグネシウム0.002%, チメロサル 0.02%, 0.01M 磷酸緩衝液) および4種のテトラゾリウム塩水溶液を濾過滅菌したものを用いた^{10,9)}。テトラゾリウム塩は0.25% TTC (triphenyl tetrazolium chloride), 0.5% NTC (neotetrazolium chloride), 0.1% BT (blue tetrazolium), 0.1-0.5% NBT (nitro blue tetrazolium) である。これらの液を寒天ブロックに1滴滴下または液体培養に等量混和し、サフラニン液では直ちに、テトラゾリウム

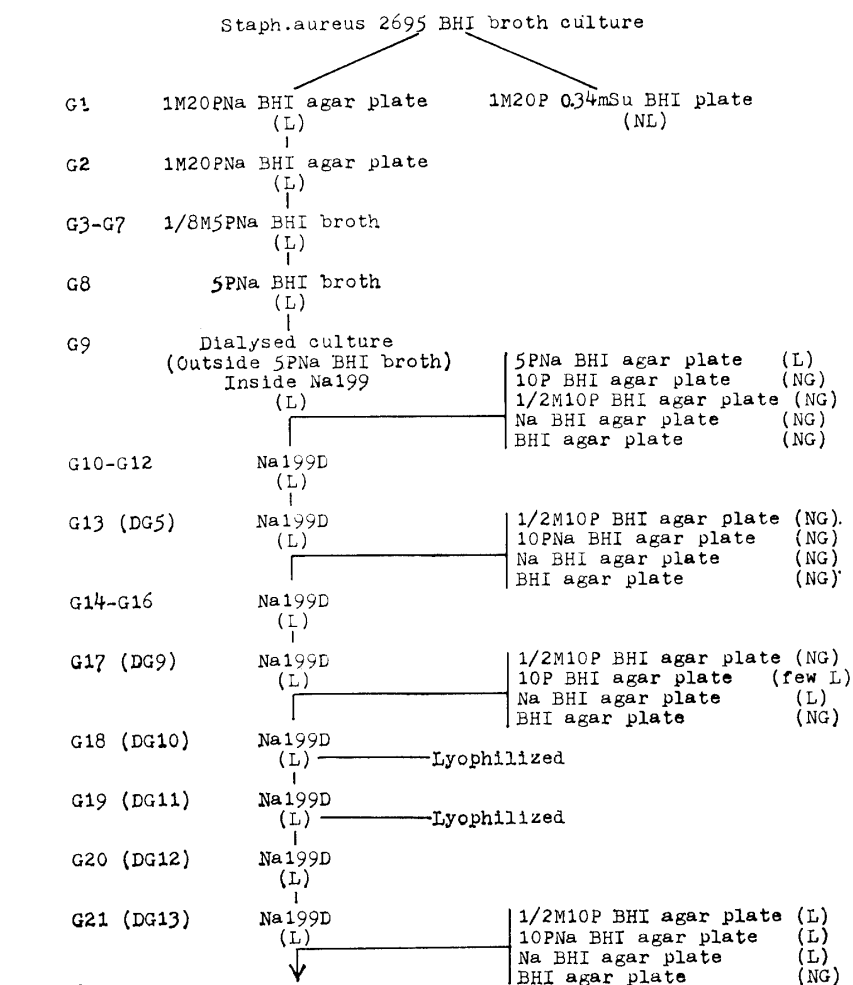
液では15分~30分後にカバーグラスで封じて鏡検した。

血清学的試験 *Staph. aureus* 2695 のフォルマリン死菌およびその stable L-form を単味または incomplete Freund adjuvant と共に兎に注射して免疫血清をつくり、この血清を用いて intact cell の超音波破壊抗原またはL型菌抗原との間でゲル内沈降反応を行い、さらに McFarland No.3 に調製した intact cell のフォルマリン死菌による concavity slide 凝集反応¹⁹⁾を行った。

結果と考察

L型の誘導 23株の供試菌中 450 μ g/ml メチシリン、20%人プラズマ、5%食塩加 BHI 寒天平板培養により発育不能だった10株を除き残りの13株ではL型の

発現がみられた。これらのL型をメチシリン、人プラズマの濃度を変化せしめた修飾培地上で継代安定化を計ったところ、限られた世代のみL型を示したものの2株、L型と intact cell を混合し純粋に分離しなかったものの7株、L型化するがメチシリンを除去すると intact cell に復帰するもの3株が得られた。そのうち2695株 (phage type 3A3C/71+(55+)) からはメチシリンを除去しても intact cell に復帰しない stable L-Form が得られた。L型の誘導の率については必ずしも一定しない^{2,8)}が、特に stable L-form にまで変化する株はかなり特異的なものであると考えられ、2695株では容易に stable L-form に変り、しかも再現性が強いのに対し、他の株では繰返し誘導を試みたが成功しなかった。ここで注目すべきことは、L型誘導中一部の菌について5%食塩の代りに0.34molの白糖を浸透



BHI: Brain heart infusion, 1M: 450 μ g/ml of methycillin, 20P: 20% of inactivated human plasma, Na: 5% of NaCl, m: mol, Su: Sucrose, L: L-form, NL: No L-form, NG: No growth, 1/8M:450/8 μ g/ml of methycillin, 1/2M: 450/2 μ g/ml of methycillin, DG: Generation in dialysed culture

Fig. 1. Adaptation of *Staphylococcus aureus* 2695 L-form to growth in dialysed culture.

圧調節剤として用いたところ、いずれの場合にもL型の誘導は見られなかったことである。このような成績はMarston¹⁴⁾、江田ら⁹⁾の報告と似ているが、一方ではMattman¹⁵⁾のように白糖でL型が発育する例もあるので確言は出来ないが、後述のようにstable L-formは食塩濃度が3%以下では発育不能であることから、少なくとも*Staph. aureus*のstable L-formにおいては食塩は単に浸透圧調節にのみはたらくものではないことが想像された。平板上で誘導されたstable L-formは液体培養に移されたが、何れも容易に発育した。2695Lの誘導の状況は図1に示した通りであって、第2代は100%L型コロニーのみとなったのでこれを56.25 μ g/mlメチシリン、5%人プラズマ、5%食塩を含むBHIプロスに培養したところ、5日目までに粘稠濁濁がみられ、染色の結果intact cellを含まない純粋のL型がみられた。第8代はメチシリンを除去した培地でもL型のみを発育を示しstable L-formとなったことがわかった。stable L-formの食塩、人プラズマ依存性を調べるため、食塩、プラズマを逐減して培養を試みたところ、プラズマは全く含まなくても発育可能であったが、食塩は3%以下の濃度では発育がみられなかった。しかし、プラズマは必須成分ではないとはいえこれを加えるとL型の発育はより良好になる。この傾向は江田ら⁹⁾の馬血清の役割と同様であった。

染色 L型誘導のはじめからブドウ糖サフラニン液および4種類のテトラゾリウム塩溶液による染色を試みたところ、ブドウ糖サフラニン液はL型をintact cellより容易に染め分けることが出来た、しかし時間と共に染色が不明確となり簡便法としてのみ有用であった。テトラゾリウムではNBTのみが有用で他は染色操作中に結晶を析出したり不染だったりで不適であった。0.2% NBT溶液ではL型菌体は青色に染まりintact cellは30分までの感作ではあまりよく染まらない。L菌体には直径3~5 μ mでcell wallが比較的短時間で染まるが、内部が不染のもの、直径が10~50 μ mに達する球体で内部やcell wall部に青染小顆粒を含むものなどがある。液体培養の場合にはこの他に0.5 μ m以下のテトラゾリウム還元性の微細顆粒が遊離してみられる。つぎにL型の濾過性を知るため0.22 μ mのポアサイズのミリポアメンブラン濾過器で濾過し、その濾液を培養したところ発育は認められなかった。しかし、次報にのべる如く平板培地上に0.22 μ mのミリポアメンブランを置きその中央にL型液体培養を1滴接種すると膜の下にL型コロニーが発現するから、L型細胞は可塑性があって、変形しながら膜孔を通過出来

るのではないかと考えられる。

透析培養 2695L第8代はメチシリンを含有しない培地でも発育可能となったので、これについて透析培養を試みた。stable L-formの液体培養の少量をL型用平板培地上に敷いた滅菌セロファンシート上に接種して37°Cに培養すると4~7日後に無色透明粘稠な菌苔が認められ、ブドウ糖サフラニン液、NBT液で直径4~50 μ mの球状菌体がみられた。培養が陳旧化するにつれて染色性もうすれ、大小不同の顆粒またはサフラニンに染まる無定形stroma様物質が見られるようになった。固型培地上の発育は粘稠で取扱いが困難なので液体培地中での透析培養を行ったところ、セロファンサック内の2695Lを含むmedium 199は3~4日目から淡黄色粘稠濁濁が認められた。注射器でガラスチューブを通して内容を採取して染色鏡検したところ前記液体培養と同様のL型のみを認めた。このセロファンサック内容は継代可能であって、2代繰り返し継代を行った透析培養は抗人プラズマ血清によるゲル内沈降反応で人プラズマを検出し得なかった。この透析培養を生理的食塩水または蒸留水中で透析すると増殖能を失うことが明らかにされた。すなわち透析培養内容には浸透圧感受性の強い微生物が存在することが確認された。2695Lの透析培養はそのまま凍結乾燥が可能であって少なくとも5年間は生存している。このような透析培養には培地中の高分子成分を含まないから、L型の菌体成分、病原性、免疫原性、菌の代謝などをintact cellと比較研究するには好都合な材料になり得るものと考えられる。さらには、液体培養であるから取り扱いも容易である上に大量培養または濃厚培養が可能であるという利点がある。しかしこの透析培養中にはトキシンおよびphageが混在することが考えられるから、実験に際してはこれらの点についての配慮が必要となる。透析培養を用いてのstable L-formの生物学的諸性状、病原性、免疫原性については次報にのべる。

L型の同定 L型菌の同定はintact cellに還元するものは還元菌について調べれば可能であるが、stable L-formは還元しないので、本実験での同定ではまず検体の増殖能をしらべ、テトラゾリウム染色で生体であることを確認したのち、予め調製した抗intact cell免疫血清、抗L型免疫血清によるゲル内沈降反応およびconcavity slide凝集反応を行った。ゲル内沈降反応の成績は図2-1, 2, 3に示した通りで必ずしも単純な反応を示したわけではなかった。すなわちhomologousおよびheterologousの菌体の超音波破碎抗原とL

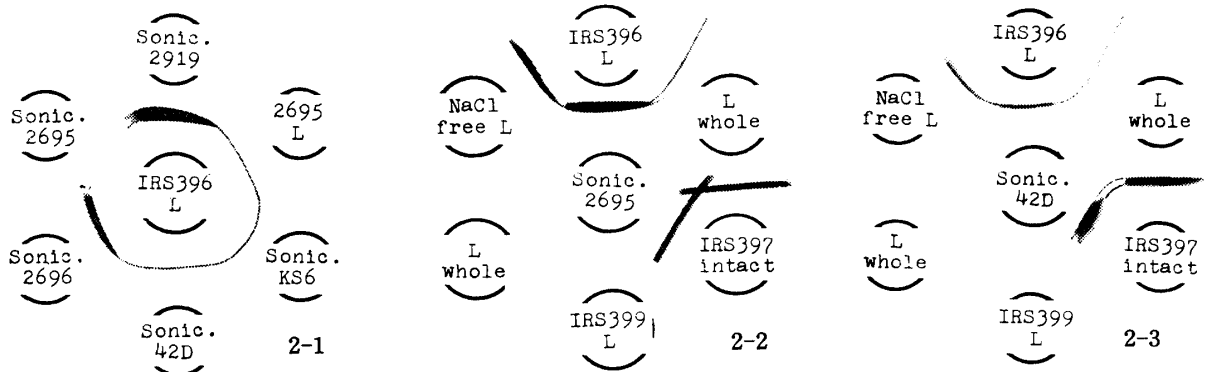


Fig. 2. Ouchterlony immunodiffusion in Noble agar with various anti 2695 immunesera and sonicated antigens and L-Form antigens. Designation of the sera is same as Table 1. Phage types of strains are: 2919 (type 1), 2695 (type 2), 2696 (type 3) 42D (type 4) and KS6 (miscellaneous).

Table 1. Concavity slide agglutination with various anti-2695 sera and heterologous strains of *Staphylococcus aureus*

Immune sera	Immunogen and route administrated	Agglutinin Used strains and phage type				
		2919(1)	2695(2)	2696(3)	42D(4)	KS6(Misc.)
IRS No.397	<i>Staph. aureus</i> 2695 formalin killed intact cell, intravenous injection.	1024* ¹	2048	NT* ²	NT	64
		512* ³	1024	8192	1024	128
IRS No.398	<i>Staph. aureus</i> 2695 formalin killed intact cell, intravenous injection.	4096	2048	NT	NT	64
		256	512	2048	256	64
IRS No.400	* <i>Staph. aureus</i> 2695 formalin killed intact cell, with Freund incomplete adjuvant, subcutaneous injection.	2048	8192	0	512	256
		2048	8192	0	128	1024
IRS No.390	<i>Staph. aureus</i> 2695 stable L-form dialysed culture whole, intravenous injection.	16	1024	NT	NT	0
		32	1024	0	0	0
IRS No.399	<i>Staph. aureus</i> 2695 stable L-form G23 dialysed culture whole, with incomplete Freund adjuvant, subcutaneous inject.	16	1024	NT	NT	0
		0	1024	0	0	0
IRS No.396	<i>Staph. aureus</i> 2695 stable L-form G23 dialysed culture 10500g sediment, with incomplete Freund Adjuvant, subcutaneous injection.	8	1024	NT	NT	0
		0	256	0	0	0

Remarks *1: Agglutinating titre of 3 weeks antiserum
*3: Agglutinatint titer of 6 weeks antiserum

*2: Not tested

型抗原に対する抗L型血清の反応は図2-1に見る如くL型抗原と heterologous 抗原とは鋭い沈降線を形成するが、2695超音波破碎抗原は2919, 2696超音波破碎抗原と相互に関係して阻止効果と見られる反応を示した。しかし図2-2でみるように異った組合せでは2695超音波破碎抗原と抗L型血清とは沈降帯を形成した。一般に抗L型血清は抗 intact cell 血清に比べて鋭い沈降線を形成する傾向があった。ただL型を Freund の adjuvant と共に注射して作った抗血清 (IRS 399) が凝集能をもつにかかわらず沈降帯を形成しなかった理由については明らかにし得なかった。concavity slide 凝集反応の結果は表1に示すように、intact cell による抗血清対フォルマリン死菌抗原では heterologous な抗

原に対しても高い凝集価を示したのに対し、L型に対する抗血清は homologous な抗原にのみ強く反応し、特異性が高かった。

以上の血清学的試験の結果を総合すると、ここに用いられた stable L-form は *Staphylococcus aureus* 2695 由来であろうと考えられた。

細胞壁成分の喪失やその他の菌体構造物の欠落または変性^{21,17)}が考えられるL型菌を抗原として用いる血清学は一面にはさらに慎重に検討されるべき問題を含みながら、免疫の促進または阻害に与する菌体成分の研究にとっては重要な手段になり得ることを示唆しているようである。

要 約

メチシリン、非働化人プラズマ、食塩を添加した BHI 寒天平板を用いて *Staphylococcus aureus* の L 型の誘導を試み、その 23 株から 4 株の L 型の純培養を得た。そのうちの 1 株 (2695L) はメチシリンを除去しても intact cell に還元しない stable L-Form にまで誘導された。この stable L-form は透析培養が可能であり凍結乾燥による保存が可能である。

この透析培養内の微生物は血清学的に *Staph. aureus* 2695 由来のものであると同定された。

謝 辞

本研究の一部は、文部省科学研究費の補助によって行われたことを附記して謝意を表明します。

文 献

- 1) Bigger, J.W.: Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet*, **2**, 497-498 (1944)
- 2) Czop, J.K. and Bergdoll, M.S.: Synthesis of enterotoxin by L-forms of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, **1** 169-173 (1970)
- 3) Diena, B.B., Wallace, R. and Greenberg, L.: Gram reaction and tetrazolium staining. *Canad. J. Microb.*, **8**, 99-103 (1962)
- 4) Diena, B.B., Wallace, R. and Greenberg, L.: The production and properties of *Salmonella typhi* spheroplasts. *Canad. J. Microb.*, **10**, 543-549 (1964)
- 5) Dienes, L., Weinberger, H. J. and Madoff, S.: The transformation of typhoid bacilli into L form under various conditions. *J. Bact.*, **59**, 755-764 (1950)
- 6) Dienes, L.: The L forms of bacteria, *Bacteriological Reviews* **15**, 245-288 (1951)
- 7) Dienes, L. and Zamecnik, P.C.: Transformation of bacteria into L forms by aminoacid. *J. Bact.*, **64**, 770-771 (1952)
- 8) 江田亨・松岡俊介・田所一郎: ブドー球菌 L-form に関する研究. I. ブドー球菌 L-form の誘導と固型培地上の形態について. *日本細菌学雑誌*, **27**, 657-664 (1972)
- 9) 江田亨・松岡俊介・田所一郎: ブドー球菌 L-form に関する研究, III. ブドー球菌 L-form の増殖および形態に及ぼす血清, 塩化ナトリウムおよび白糖の影響. *日本細菌学雑誌*, **27**, 801-807 (1972)
- 10) Eidus, L., Diena, B.B. and Greenberg, L.: Observations on the use of tetrazolium salts in the vital staining of bacteria. *Canad. J. Microb.*, **5**, 245-250 (1959)
- 11) Jackson, G.G. and Petersdorf, R.G. Ed.: Role of protoplasts, spheroplasts and L-forms in disease. In Guze, L.B. (ed.), *Microbial protoplasts, spheroplast, and L-forms* p.345-502, The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1968)
- 12) Klieneberger, E.: The natural occurrence of pleuropneumonia-like organisms in apparent symbiosis with *Streptococcus moniliformis* and other bacteria. *J. Path. Bact.*, **40**, 93-105 (1935)
- 13) Klieneberger, E.: L-form of bacteria. In Gunsalus, I. C. (ed.), *The bacteria*. Vol.1, p. 361-386, Academic Press Inc., New York (1960)
- 14) Marston, J.H.: Production and cultivation of staphylococcal L-forms. In Guze, L.B. (ed.), *Microbial protoplasts, spheroplasts and L-forms*. p. 212-220, The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1968)
- 15) Mattman, L.H., Tunstall, L.H. and Rossmore, H.W.: Induction and characteristics of staphylococcal L-forms. *Canad. J. Microb.*, **7**, 705-713 (1961)
- 16) McGee, Z.A. and Wittler, G.: The role of L-phase and other wall-defective microbial variants in disease. In Hayflick, L. (ed.), *The Mycoplasmatales and the L-phase of bacteria*. p.697-720, North-Holland Publ. Co., Amsterdam (1969)
- 17) Reusch, V.M., Jr., and Panos, C.: Defective synthesis of lipid intermediates for peptidoglycan formation in a stabilized L-form of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bact.*, **126**, 300-301 (1970)
- 18) Sato, H., Diena, B.B. and Greenberg, L.: The production of spheroplasts by rapid-growing non-virulent mycobacteria. *Canad. J. Microb.*, **11**, 807-810 (1965)
- 19) Sato, H., Murata, M., Laidley, R., Diena, B.B. and Greenberg, L.: A rapid quantitative microtitration of salmonella antibody. *Am. J. Clin. Path.*, **55**, 729-732 (1971)
- 20) Sharp, J.T.: The role of L-forms of bacteria in disease. In Sharp, J.T. (ed.), *The role of mycoplasmas and L-forms of bacteria in disease*. p. 313-323, Charles C. Thomas Publ., Springfield (1970)
- 21) Slabyj, B.M. and Panos, C.: Teichoic acid of a stabilized L-form of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bact.*, **114**, 934-942 (1973)
- 22) Young, R.M. and Dahlquist, E. H.: Pathogenicity of L forms of *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Clin. Path.*, **48**, 466-473 (1967)
- 23) Weibull, C.: The isolation of protoplasts from *Bacillus megaterium* by controlled treatment with lysozyme. *J. Bact.*, **66**, 688-695 (1953)

Summary

Induction of L-forms from 23 strains of *Staphylococcus aureus* was attempted. Pure culture of L-forms was obtained from 4 strains in a medium of the following composition: BHI agar (Difco) with NaCl added to give a final concentration of 5%. Heat inactivated human plasma (20%) and methycillin (450 µg/ml) was added just prior to pouring plates. After serial transfer of L-forms in solid or liquid medium, one strain which was designated as 2695L finally converted to stable L-forms. No reversion of the 2695L to parent intact cells was observed following continued cultivation or repeated serial transfer to media free from methycillin. Dialysed liquid culture of the stable L-forms was successfully performed. Results of serological studies using dialysed cultures and intact cells indicated that this stable L-forms originated in *Staphylococcus aureus* 2695 strain.